

⑧

1/23/1  
DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013262038

WPI Acc No: 2000-433939/200038

XRAM Acc No: C00-132091

Preparation of a protein labelled at its C-terminal

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM CORP (MITU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Abstract (Basic): JP 2000139468 A

NOVELTY - Preparation of a protein labelled at its C-terminal comprises transcribing a product from a DNA consisting of a coding region with the termination codon deleted under the control of a promoter region in a cell free translation system or in a living cell in the presence of a labelling reagent. The protein constitutes a labelling substance portion and an acceptor portion consisting of a compound with ability to combine to the C-terminal of the protein.

USE - The protein is useful for the identification of a compound inhibiting or activating the activity of said protein.

pp; 9 DwgNo 0/3

Title Terms: PREPARATION; PROTEIN; LABEL; TERMINAL

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07K-001/13; C12P-021/00

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim]

[Claim 1] The manufacture technique of protein [ label-izing a C terminus / characterizing by making protein synthesis perform in the inside of a non- cell translation system or a viable cell, using a production / imprinting from DNA / becoming the label / consisting of a marker / section from the coding / deleting a stop codon / that it is in the bottom of the control of the bottom of presence / a label / constituting from the acceptor / consisting of a compound / section / -ized reagent /, and a promoter region ] field of protein ]

[Claim 2] Technique given in the claim 1 which is DNA which a coding field becomes from the length corresponding to 50-3,000 amino acid residue.

[Claim 3] Technique given in the claim 1 whose label section of a label-ized reagent is the fluorescence nature matter, the radioactive substance, or a nonradioactive marker.

[Claim 4] Technique given in the claim 1 whose acceptor section of a label-ized reagent is a nucleic acid or a nucleic-acid derivative.

[Claim 5] a nucleic-acid derivative — a nucleic acid and amino acid — technique given in the claim 4 which is the compound which the amino acid derivative combined youthfully

[Claim 6] Technique given in the claims 4 or 5 whose nucleic-acid derivatives are a puromycin or a puromycin derivative.

[Claim 7] Technique given in the claim 1 for which a non-cell translation system uses a wheat germ extract or a lagomorph reticulocyte lysate.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

[Detailed description]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to the technique of label-izing a proteinic C terminus efficiently with a label-ized reagent. A means very effective [ the C terminus label-ized method of the protein by the label-ized reagent of this invention is effective in the proteinic detection and the proteinic identification discovered by various non-cell translation systems and viable cells, and ] when increasing the efficiency of and automating the proteinic identification which held the function correspond, in the functional analysis of the gene accumulated in genome analysis, and the functional analysis of protein especially like the nature interaction of nucleic-acid \*\*\*\*\* or the nature interaction of protein \*\*\*\*\* offers.

[0002]

[Prior art] The activity label-ized method make a translation product incorporate the amino acid which carried out the label by activity element called <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H, and <sup>14</sup>C is common to label-izing of the protein made to discover by the non-cell translation system or the viable cell. In this case, in order to use activity, a special facility etc. is needed on a safety control. For this reason, the technique of carrying out the following as technique which does not use a radioactive compound is learned. According to this technique, the thing (biotin-lysine-tRNA) which carried out covalent bond of the biotin to epsilon-amino group of the lysine of amino acid, and made tRNA with the anticodon of a lysine carry out ester combination of this first is compounded, it supplies to a non-cell translation system, and a translation product is biotin-ized. A translation product is moved to a membrane after an electrophoresis, and carries out the chemiluminescence of the translation product by the alkaline phosphatase with the fusion protein of an alkaline phosphatase and streptavidin. A translation product is identified for this using an X-ray film etc. (Promega (1993), Technical Bulletin, No.182, and p2). Compound biotin-lysine-tRNA is a labile (it is six months at -70 degree C) very much, and this technique has the fault of being expensive. Furthermore, the trouble of it being complicated and taking time also has the prescription to identification. Therefore, this technique is very disadvantageous for the automation for a lot of sample processing. Furthermore, since the lysine side chain of a plurality [ protein / which was translated ] is embellished with the biotin, a function and structure may be changing with the original thing.

[0003]

[Object of the Invention] label-izing of translation protein [ in a non-cell translation system and a viable cell in the technical problem of this invention ] — setting — 1 — efficient 2 — simple 2 — it is in offering the manufacture technique of the protein which fulfilled the conditions that economical 3 label-ized reagent is stability for a long period of time and that the function of four translation products and structure were not influenced, such as five safeties, and with which the C terminus was label-ized

[0004]

[The means for solving a technical problem] The label section which consists of a marker as a result of inquiring zealously that this invention person etc. should solve the above-mentioned technical problem, Under presence of the label-ized reagent which consists of the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminus, If protein synthesis is made to perform in a non-cell translation system or a viable cell, using as mold the production imprinted from DNA which consists of a coding field under a control of a promoter region where the stop codon was deleted Without spoiling the function of a proteinic C terminus, it finds out that the C terminus of the protein of the amount of macromolecules is label-ized efficiently, and came to complete this invention. Namely, under presence of the label-ized reagent which consists of the label section which this invention becomes from (1) marker, and the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminus, Consist of making protein synthesis perform in a non-cell translation system or a viable-cell system, using as mold the production imprinted from DNA which consists of a coding field under a control of a promoter region where the stop codon was deleted. The proteinic manufacture technique that the C terminus was label-ized, technique given in one term it is [ term ] DNA which (2) coding field becomes from the length corresponding to 50-3,000 amino acid residue, (3) Technique given in one term whose label section of a label-ized reagent is the fluorescence nature matter, the radioactive substance, or a nonradioactive marker, (4) Technique given in one term whose acceptor section of a label-ized reagent is a nucleic acid or a nucleic-acid derivative, (5) — a nucleic-acid derivative — a nucleic acid and amino acid — technique given in four term which is the compound which the amino acid derivative combined youthfully — (6) It consists in technique given in 4 or 5 term whose nucleotide derivative is a puromycin or a puromycin derivative, and technique given in one term to which a (7) non-cell translation system uses a wheat germ extract or a lagomorph reticulocyte lysate. The characteristic feature of this invention is in a non-cell translation system or a viable-cell system under a control of a promoter region. The production (manipulation mRNA) imprinted from DNA which consists of a coding field where the stop codon was deleted is added as mold. If protein synthesis is made to perform under the last concentration presence of label-ized reagents, such as puromycin of M or puromycin derivative, of 15-50micro The quality of a label ghost combines with the C terminus of translation protein efficiently, and it is in the protein of the amount of macromolecules with which the C terminus was label-ized being obtained. The compound which carried out the

chemical bond of the fluorescent substances, such as a fluorescein, to the puromycin was understood that proteinic identification is possible, without using the activity matter, in order to combine with the C terminus of translation protein like a puromycin, without spoiling the function of a proteinic C terminus. That is, label-ized reagents, such as a fluorescence-ized puromycin, are added to a non-cell translation system, the electrophoresis of the resultant is carried out after a reaction, and translation protein can be easily identified by reading gel with a fluorescence image analyzer as it is.

[0005]

[Gestalt of implementation of invention] The protein with which the C terminus of the protein of this invention was label-ized adds the transcript (manipulation mRNA) of processed DNA to a non-cell translation system or a viable-cell system as mold, and is manufactured by making protein synthesis perform under presence of the label-ized reagent which consists of the label section which consists of a marker, and the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminus.

[0006] The production (processed mRNA) imprinted from DNA which consists of a coding field under a control of a promoter region where the stop codon was deleted is acquired by imprinting using RNA polymerase from DNA which consists of a promoter region and a coding field where the stop codon was deleted. As for the length of a coding field, it is desirable that it is DNA of a length corresponding to 50-3,000 amino acid residue. That is, since according to the technique of this invention-izing of the C terminus can be efficiently carried out [ label ] even if it is protein of the amount of macromolecules, it is very useful to identification and its functional analysis of the protein obtained in genome analysis.

[0007] By the technique of this invention, a proteinic C terminus is label-ized with a label-ized reagent. A label-ized reagent consists of the label section and the acceptor section. The label section is usually chosen from the fluorescence nature matter, the radioactive substance, and a nonradioactive marker. As a fluorescent substance of the label section, it may have free functional groups (for example, a carboxyl group, a hydroxyl group, amino group, etc.) besides a fluorescein sequence, and as long as it is the various fluorochromes which can be connected with nucleotide derivatives, such as a puromycin or a puromycin Mr. compound, through a spacer (for example, rhodamine sequences, eosine sequences, NBD sequences, etc.), you may be anything.

[0008] in addition, nonradioactive markers, such as a coenzyme like a radioactive marker like 33P, 32P, and 35S, and a biotin as label section, protein, a peptide, a saccharide, lipids, coloring matter, and a polyethylene glycol, — or — a label — if it is the compound [ -izing / a compound ], the modality of the compound and a size will not be asked

[0009] As acceptor section which is another component which constitutes a label-ized reagent, a nucleic acid or a nucleic-acid derivative is usually used. The compound which the matter which has the chemical structure skeleton similar to a nucleic acid, amino acid, or amino acid as a nucleic-acid derivative combined chemically can be used. As a typical compound, the puromycin (Puromycin) which has amide combination, and a 3'-N-aminoacyl puromycin amino nucleoside (3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside and PANS-amino acid), for example, the PANS-all amino acid compound corresponding to PANS-Gly of a glycine, PANS-Val of a valine, PANS-Ala of an alanine, in addition all amino acid in the amino acid section, are mentioned. Moreover, a 3'connected by amide combination formed as a result of amino-group [ of - amino adenosine ] and carboxyl group of amino acid carrying out dehydration condensation'-N-aminoacyl adenosine amino nucleoside (3'-Aminoacyladenosine aminonucleoside, AANS-amino acid), for example, the AANS-all amino acid compound corresponding to AANS-Gly of a glycine, AANS-Val of a valine, AANS-Ala of an alanine, in addition all amino acid in the amino acid section, can be used as a chemical bond. Moreover, that in which a nucleoside or a nucleotide, and amino acid carried out ester combination can be used. In addition, the matter which has the chemical structure skeleton and a base similar to a nucleic acid or a nucleic acid, and the matter which has the chemical structure skeleton similar to amino acid can be used for all the compounds that made such and were combined if combination is chemically possible.

[0010] The above-mentioned puromycins (compound of an I view 1) are bacteria (). [ Nathans, D.Proc(1964).Natl.Acad.Sci.USA, 51,585-592; Takeda, ] [ Y.et al.(1960) ] J. Biochem.48,169-177 and animal cell () [ Ferguson, J.J.(1962) Biochim.Biophys.Acta 57,616-617; Nemeth, ] [ A.M.& de ] Checking the protein synthesis of la Haba, G.L.J(1962).Biol.Chem.237, and 1190-1193 is known. Since the structure of a puromycin is similar with the structure of aminoacyl tRNA, it goes into A site on a ribosome, reacts with the peptidyl tRNA which exists in P site, and is isolated from a ribosome as a peptidyl puromycin (Harris, R.J.Biochim (1971).Biophys.Acta 240, and 244-262).

[0011] In the protein synthesis system, when cut mRNA without a stop codon is used for mold, it is known that protein synthesis will stop. Thus, when there is no codon corresponding to mRNA, even if aminoacyl tRNA and a termination factor go into A site on a ribosome, the catalyst of them is not carried out by the transpeptidation. On the other hand, it turns out that a catalyst is carried out by the transpeptidation of a ribosome and the derivative of a puromycin or this invention can be efficiently combined with a proteinic C terminus to A site on a ribosome also in such the status.

[0012] In order to confirm this, it is necessary to create mRNA with a stop codon, and mRNA without a stop codon, and to investigate the luminous efficacy of the formation of a fluorescence label of a proteinic C terminus with the puromycin derivative of fluorescence nature, for example, a full \*\*\*\*\* nil puromycin, (Fluorpur) (compound of II of drawing 1 ) in addition to a non-cell translation system.

[0013] what does not have T7 promoting agent from 5' side which was shown in drawing 2 , Kozak array (Cossack array), the coding field of a beta lactamase, and it and a stop codon in order to prepare mRNA of the thing without the stop codon of the beta lactamase (molecular weight 32 kDa) with molecular weight standard as protein, and a certain thing (A) — a certain thing (B) Gene DNA was created.

[0014] As a puromycin derivative of fluorescence nature, the puromycin was chosen as a fluorescein and acceptor section as label section, and the chemosynthesis of the label-ized compound of the fluorescence nature which connected both by the chemical bond, for example, the Fluorpur, (compound of II of a view 1) was carried out.

[0015] In the non-cell linked transcription translation of an eukaryote, for example, the translation system of a lagomorph reticulocyte lysate (Nuclease treated Rabbit reticulocyte lysate) or a wheat germ extract The T7 above-mentioned promoting

agent, Kozak array, the coding field of a beta lactamase, If add the transcript (manipulation mRNA) from DNA of the thing without it and a stop codon, and a certain thing as mold, protein synthesis is made to perform under Fluorpur presence and it investigates about proteinic fluorescence label-ization It turns out that Fluorpur has combined with the C terminus of the overall-length protein of a beta lactamase clearly by the concentration of 16microm ( drawing 3 A ). Fluorpur As for the formation of a fluorescence label of the overall-length protein of a beta lactamase to twist, the non-cell linked transcription translation of Escherichia coli was also checked. When the non-cell translation system of a wheat germ extract was used especially, compared with mRNA (lane 3 of drawing 3 ) in which a stop codon has the direction (lane 1 of drawing 3 ) of mRNA without a stop codon, it was checked that label-ized luminous efficacy increases by about 10 times.

[0016]

[Example] Although an example explains this invention still concretely below, it should not consider that the following example is an aid which obtains the concrete recognition about this invention, and the domain of this invention is not limited at all by the following example.

[0017] pBR322 plasmid (Sutcliffe, J.G.(1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 3737-3741) in which the creation material:beta-lactamase gene of a construction and mRNA of DNA for C terminus fluorescence label-ized <1> imprint of the beta lactamase using the non-cell translation system (a wheat germ extract, lagomorph reticulocyte lysate) of example 1 eukaryotic cell appeared was supplied by Mr. Masamichi Ishizaka (Kyushu University, the Mitsubishi Chemical life-science lab). E. DNA containing T7 promoting agent and Kozak consensus sequence of coli pAR vector (Rosenberg and A.H.et.al.(1987) Gene 56,125-135) was compounded in Nippon Flour Mills Co., Ltd. The id peck oligo service, and the DNA / RNA primer were compounded for DNA primer for PCR with a Japanese \*\*\*\*\* set, respectively. Various enzymes, a reagent, etc. are :ribonuclease Ribonuclease A which used the commercial thing. (sigma); nucleic-acid modification enzyme T4 DNA Polynucleotide Kinase (NEB), T4 DNA ligase (NEB) ; thermal-resistance DNA synthetase Gold Taq. Polymerase (Perkin-Elmer) ; RNA synthetase kit Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega); cap analog RNA capping Analog (Gibco BRL); non-cell translation system kit:lagomorph reticulocyte lysate (Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, and Promega) wheat germ extract (Wheat Germ Extract and Promega) ; electrophoresis reagent All of an acrylamide, an acrylamide screw, SDS, etc. are the products made from \*\*\*\*\*. Primer remover Primer Remover It purchased from Edge.

[0018] Technique: DNA ( drawing 2 ) with DNA array (T7 promoting-agent array) recognized by the RNA polymerase of the high Escherichia coli virus T7 of imprint luminous efficacy and the array (Kozak consensus array) it is tended to recognize the ribosome of an eukaryotic cell in the case of a translation was built as follows. First, the field with the above-mentioned array and the field with a beta-lactamase gene are created independently. The chemosynthesis of the 1 chain DNA (array number 1) containing T7 promoting-agent array and Kozak consensus array is carried out, and DNA primer (array number 2), and DNA / RNA primer (array number 3) perform PCR. They are DNA / RNA primer (array number 4), using as mold pBR322 plasmid in which the beta-lactamase gene appeared on the other hand. A beta-lactamase gene DNA field is amplified by PCRing by DNA primer (array number 5). The RRR method (Nishigaki and K.et al.(1995) Chem.Lett.131-132) is followed in these, and it is a RNase to each PCR reaction mixture. A is added, by making it react at 60 degrees C for 30 minutes, the phosphoric-acid diester combination by the side of 3' of RNA of DNA / RNA primer (the array number 3 and array number 4) is cut, it projects, and the terminal is made. After a phenol extraction, with a primer remover (Primer Remover), a primer and the cut DNA fragment are removed and ethanol precipitation of these is carried out. after xeransis and T4 DNA the buffer for ligases — melting — T4 DNA a polynucleotide kinase (Polynucleotide Kinase) — adding — after 45 degrees C and a 30 minute reaction — further — since temperature is gradually lowered to 16 degrees C over 30 minutes — T4 DNA The ligase was added and two above-mentioned DNA fields were combined. a part of this reaction mixture is extracted — using DNA primer (the array number 2 and array number 5), again, it amplified by PCR and (A) of drawing 2 was created to the imprint

[0019] DNA for an imprint (B of drawing 2 ) which consists of a beta-lactamase gene with a stop codon on the other hand was created by using another DNA primer (array number 6) instead of DNA primer (array number 5) in the above-mentioned technique. Two DNA created by the above-mentioned technique is RNA synthesis kits. It imprinted using Ribomax Large Scale RNAProduction System (Promega). It is a cap analog in order to gather synthetic luminous efficacy. RNA capping Analog (Gibco BRL) was used and 5' side of mRNA was embellished. In order to remove a cap analog and superfluous NTP, ethanol precipitation was performed using the primer remover.

[0020] the manufacture material:puromycin (puromycin) of <2> fluorescence level-ized reagent Fluorpur — the full from a sigma — me — \*\*\*\*\* (6-N-carboxy-di-O-pivaloyl-fluorescein-hexyl-O-(2-cyanoethyl)-(N and N'-diisopropyl)-phosphoramidite) purchased Nihon Millipore to the silica gel for chromatography for the tetrazole from Merck from Japanese par \*\*\*\*\* respectively

[0021] Technique: Melt a puromycin (26 mg, 48 mumol) to the xeransis pyridine of 3 ml, make it evaporate under reduced pressure, and make it dehydrate. This operation is repeated 3 times. this — 4% tetrazole / acetonitrile solution of 5 ml, and full — me — \*\*\*\*\* is added and it is made to agitate at a room temperature It acts as the monitor of the reaction with the thin-layer chromatography (TLC, expansion solvent:chloroform:methanol =9:1) of silica gel. Usually, a reaction is ended in 2 hours. Solution which \*\*\*\*\*ed under reduced pressure of a solvent after the reaction, and melted the iodine of 0.1 M to this a tetrahydrofuran / pyridine / water =80:40:2 2 ml is added and the phosphite-triester generated while making it agitate at a room temperature is oxidized. It removes under reduced pressure of a solvent after 1 hour and a half, and the remainder is extracted by chloroform. An extract removes a solvent under reduced pressure, after making it dry under sulfuric-anhydride magnesium presence. This is applied to a silica gel column chromatography, and it is made to elute by chloroform / methanol =90:10. Fluorpur which the protective group attached is eluted by silica gel TLC (expansion solvent:chloroform:methanol =9:1) at the place of Rf 0.26. Next, the deprotection of a protective group is performed. Fluorpur which the protective group attached — dark — mixed solution of aqueous ammonia / ethanol =2:1 1 ml In addition, elimination of beta-cyano ethyl group obtains 7mg (II of drawing 1 ) of Fluorpurs. That synthetic compounds are Fluorpur, the molecular ion of [M+H]<sup>+</sup> was identified that the ultraviolet visible absorption spectrum

of the solution of the pH 9 appears in 272 nm (puromycin section origin) and 494 nm (fluorescein section origin) from appearing in m/z1010 by the MALDI/TOF mass spectrometry.

[0022] mRNA which <3> protein fluorescence-label-ization-created (1) Lagomorph reticulocyte non-cell translation system Rabbit In two kinds of translation systems of ReticulocyteLysate Systems, Nuclease Treated, and (Promega) (2) wheat-germ non-cell translation system Wheat Germ Extract (Promega) It was made to react in addition for 60 minutes with each optimum reaction temperature (lagomorph reticulocyte non-cell translation system; 30 degrees C, wheat germ non-cell translation system; 25 degrees C) so that the last concentration of Fluorpur may be set to 16microM.

[0023] the non-cell translation product of the above [ authentication of the protein label-ized by the authentication full \*\*\*\*\* nil puromycin (Fluorpur) of label-izing of <4> protein ] — a sample — carrying out — SDS-PAGE — 20 — it carried out by reading directly the gel which carried out the migration for 90 minutes with fluorescence imaging equipment (FluorImager 595 and Molecular Dynamics) V constant voltage The overall-length beta lactamase (molecular weight 32kDa) by which the fluorescence label was carried out most efficiently was obtained when it added using mRNA imprinted from DNA (A of drawing 2 ) without a stop codon using a wheat germ system non-cell translation system so that Fluorpur may be set to last concentration M of 16micro (lane 1 of drawing 3 A ). however, the same wheat germ system non-cell translation system is used — even if Fluorpur was last concentration M of 16micro, when mRNA imprinted from DNA (B of drawing 2 ) with a stop codon was used, the luminous efficacy of the formation of a fluorescence label was 1/10 or less compared with the case of DNA without a stop codon (lane 3 of drawing 3 B ) Moreover, also in the non-cell translation system of a lagomorph reticulocyte, label-ized luminous efficacy went up three to 4 times compared with the case (lane 6 of drawing 3 A ) where mRNA imprinted from DNA with a stop codon is used, by the system (lane 5 of drawing 3 A ) made to translate using mRNA imprinted from DNA without a stop codon. What dyed the same gel by the fluorescent-staining method (SYPRO Orange) of conventional protein is shown in drawing 3 B for the comparison. When it dyed by SYPRO Orange, the protein (beta lactamase) translated by supplied mRNA was buried into the protein of the non-cell translation system origin, and was not able to be checked. From the above thing, it was checked that label-izing of the protein by the technique of this invention is effective in identification of the synthetic protein by SDS-PAGE.

[0024]

[Effect of the invention] By this invention, it was enabled to label-ize efficiently the C terminus of the protein by which translation synthesis was carried out regardless of the prokaryotic cell and the eukaryotic cell using the non-cell translation system and the viable cell according to fluorescence etc. this invention enables it to carry out safely and more quickly economically identification of the protein discovered from a gene, and functional analyses, such as those interactions. or [ in addition, / combining with this protein the protein with which the C terminus obtained by the technique of this invention was label-ized ] — or it is useful also to identification of the compound which carries out an interaction, and checks or activates the activity That is, this compound can also be identified by the technique of detecting the C terminus label of this protein that disappears [ which disappears and, and remains ]. [ which joined together or interacted with the compound with which the C terminus obtained by the technique of this invention tends to screen the label-ized protein ]

[Array table]

SEQUENCE-LISTING <110> Mitsubishi Chemical-Corporation <120> A process for the production of C-terminal-labelled protein <130> <140> <141> 1988-11- <160> 6 <170> PatentIn Ver.2.0 <210> 1 <211> 88 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 1 gatcccgcga aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaat 60 aattttgttt aactttaaga aggagatg 88 <210> 2 <211> 33 <212> DNA<213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 2 gatcccgcga aattaatacg actcactata ggg 33 <210> 3 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <220> <221> misc\_feature <222> (6) <223> n is ribocytidylic acid. <400> 3 ggaagncatg-gtggcatctc-cttcttaaa 29 <210> 4 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <221> misc\_feature <222> (6) <223> n is ribocytidylicacid. <400> 4 ggttcnaaac aaagcactat tgcaactggc 29 <210> 5 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 5 ccaatgctta atcagtggagg cacctatctc a 31 <210> 6 <211> 32<212> DNA <213> Artificial Sequence <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 6 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg ag32 [Array table free text] Array number 1-6:synthetic DNA

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[An easy explanation of a drawing]

[ Drawing 1 ] A puromycin and the chemical structure of the derivative. I is a puromycin (puromycin) and II is a full \*\*\*\*\* nil puromycin (Fluorpur).

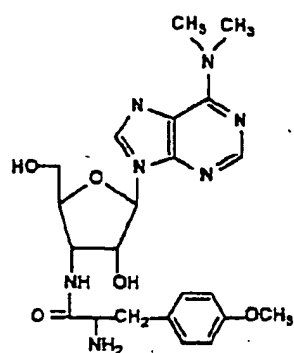
[ Drawing 2 ] The construction view of gene DNA of a beta lactamase. gene DNA in which the genes DNA and B in which A does not have a stop codon have a stop codon it is .

[ Drawing 3 ] The polyacrylamide-gel-electrophoresis photograph which carried out the fluorescent staining of it to the polyacrylamide-gel-electrophoresis photograph (A) in which combination of Fluorpur to the C terminus of a beta lactamase is shown by SYPRO Orange (B).

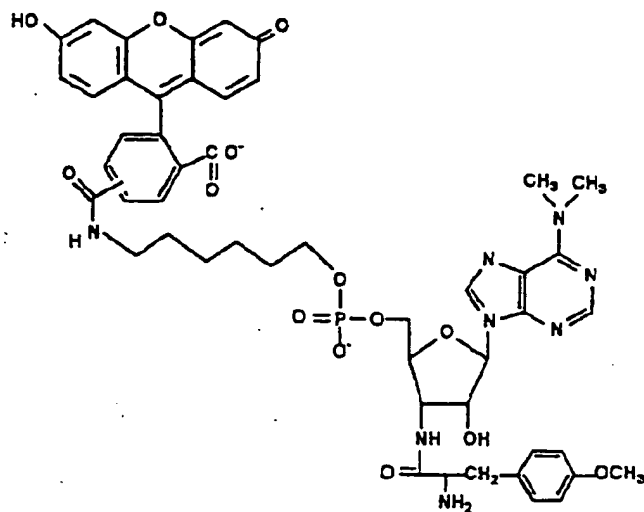
---

[Translation done.]

rawing selection drawing 1



ピューロマイシン (puromycin, I)



フルオレセニルピューロマイシン (Fluorpur, II)

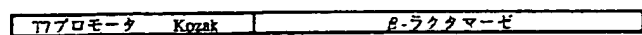
Translation done.]



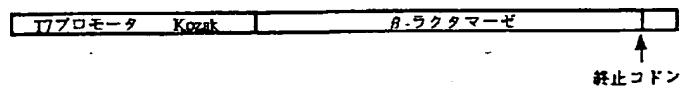
rawing selection drawing 2

---

(A)



(B)

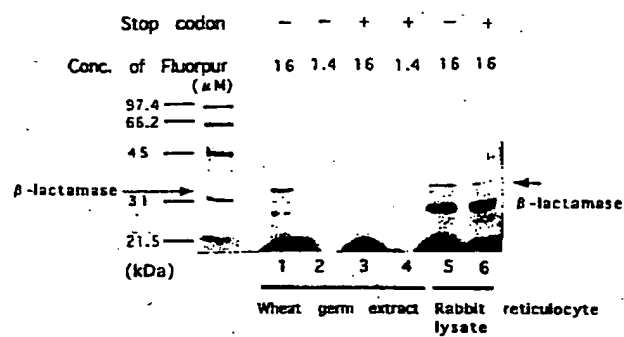


---

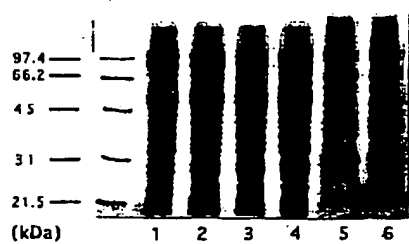
Translation done.]

rawing selection drawing 3

(A)



(B)



Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139468

(P2000-139468A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テマート (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/13		C 0 7 K 1/13	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	C 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平10-320093

(22) 出願日 平成10年11月11日 (1998.11.11)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 柳川 弘志

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学  
学生命科学研究所内

(72) 発明者 根本 直人

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学  
学生命科学研究所内

(74) 代理人 100103997

弁理士 長谷川 暁司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法

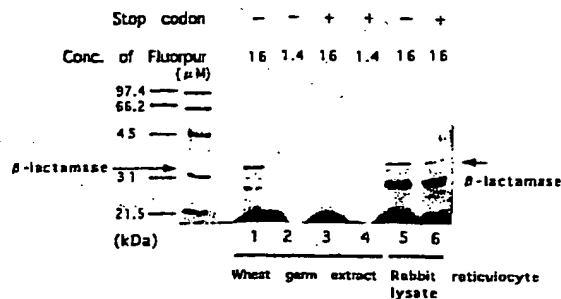
(57) 【要約】

【課題】 タンパク質のC末端をラベル化試薬により効率的にラベル化する方法の提供。

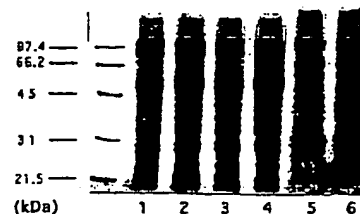
【解決手段】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞系でタンパク質合成を行う。

【効果】 本発明のラベル化試薬によるタンパク質のC末端ラベル化法は、種々の無細胞翻訳系や生細胞で発現するタンパク質の検出および同定に有効であり、ゲノム解析によって集積する遺伝子の機能解析において、対応する機能を保持したタンパク質の同定、特に核酸-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用のようなタンパク質の機能解析を効率化、自動化する上で極めて有効な手段を提供する。

(A)



(B)



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中でタンパク質合成を行わせることを特徴とする、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法。

【請求項2】 コーディング領域が50-3,000アミノ酸残基に対応する長さからなるDNAである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質、または非放射性標識物質である請求項1に記載の方法。

【請求項4】 ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である請求項1に記載の方法。

【請求項5】 核酸誘導体が、核酸とアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 核酸誘導体が、ピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体である請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 無細胞翻訳系が小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液を使用する請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、タンパク質のC末端をラベル化試薬により効率的にラベル化する方法に関する。本発明のラベル化試薬によるタンパク質のC末端ラベル化法は、種々の無細胞翻訳系や生細胞で発現するタンパク質の検出および同定に有効であり、ゲノム解析によって集積する遺伝子の機能解析において、対応する機能を保持したタンパク質の同定、特に核酸-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用のようなタンパク質の機能解析を効率化、自動化する上で極めて有効な手段を提供する。

## 【0002】

【従来の技術】 無細胞翻訳系や生細胞で発現させたタンパク質のラベル化には、<sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>Cといった放射能元素でラベルしたアミノ酸を翻訳産物に取り込ませる放射能ラベル化法が一般的である。この場合、放射能を利用するため安全管理上、特別な施設等が必要とされる。このため、放射性化合物を使用しない方法として下記する方法が知られている。この方法によれば、まず、アミノ酸のリジンのε-アミノ基にビオチンを共有結合させ、これをリジンのアンチコドンをもつtRNAにエステル結合させたもの（ビオチン-リジン-tRNA）を合成し、無細胞翻訳系に投入し、翻訳産物をビオチン化する。翻訳産物は、電気泳動後、メンブレンに移し、アルカリフォスファターゼとストレプトアビジンの融合タンパク質によ

って、翻訳産物をアルカリフォスファターゼにより化学発光させる。これを、X線フィルム等を使って、翻訳産物を同定する（Promega社、（1993）Technical Bulletin, No. 182, p2）。この方法は、合成したビオチン-リジン-tRNAが極めて不安定（-70℃で6ヵ月）であり、高価であるという欠点を有する。さらに、同定までの処方が繁雑で時間がかかるという問題点もある。したがって、この方法は、大量の試料処理のための自動化には極めて不利である。さらに、翻訳されたタンパク質は、複数のリジン側鎖がビオチンで修飾されているために、機能および構造が本来のものと変化している可能性がある。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、無細胞翻訳系および生細胞における翻訳タンパク質のラベル化において、1) 効率的である、2) 簡便である、2) 経済的である、3) ラベル化試薬が長期間安定である、4) 翻訳産物の機能、構造が影響を受けない、5) 安全性などの条件を満たした、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中でタンパク質合成を行わせると、タンパク質のC末端の機能を損なうことなく高分子量のタンパク質のC末端が効率的にラベル化されることを見出し本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、（1）標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞系中でタンパク質合成を行わせることからなる、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法、

（2）コーディング領域が50-3,000アミノ酸残基に対応する長さからなるDNAである1項に記載の方法、（3）ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質、または非放射性標識物質である1項に記載の方法、（4）ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である1項に記載の方法、（5）核酸誘導体が、核酸とアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である4項に記載の方法、（6）ヌクレオチド誘導体が、ピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体である4または5項に記載の方法、（7）無細胞翻訳系が小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液

を使用する1項に記載の方法、に存する。本発明の特徴は、無細胞翻訳系または生細胞系にプロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物(加工mRNA)を鋳型として加え、最終濃度15~50 $\mu$ Mのピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体などのラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせると、翻訳タンパク質のC末端にラベル化物質が効率よく結合し、C末端がラベル化された高分子量のタンパク質が得られることにある。ピューロマイシンにフルオレセイン等の蛍光物質を化学結合させた化合物は、ピューロマイシンと同様、タンパク質のC末端の機能を損なうことなく翻訳タンパク質のC末端に結合するため、放射能物質を使用することなくタンパク質の同定が可能であることがわかった。すなわち、無細胞翻訳系に蛍光化ピューロマイシン等のラベル化試薬を加え反応後、その反応生成物を電気泳動し、ゲルをそのまま蛍光イメージアナライザーで読み取ることで、容易に翻訳タンパク質を同定できる。

#### 【0005】

【発明の実施の形態】本発明のタンパク質のC末端がラベル化されたタンパク質は、加工されたDNAの転写産物(加工mRNA)を無細胞翻訳系または生細胞系に鋳型として加え、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせることによって製造される。

【0006】プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物(加工されたmRNA)は、プロモーター領域と、終止コドンが削除されたコーディング領域とからなるDNAからRNAポリメラーゼを用いて転写することによって得られる。コーディング領域の長さは、50~3,000アミノ酸残基に対応する長さのDNAであるのが好ましい。すなわち、本発明の方法によれば、高分子量のタンパク質であっても効率よくそのC末端をラベル化できるので、ゲノム解析で得られるタンパク質の同定やその機能解析にきわめて有用である。

【0007】本発明の方法では、ラベル化試薬によりタンパク質のC末端がラベル化される。ラベル化試薬は、ラベル部とアクセプター部とから構成される。ラベル部は、通常、蛍光性物質、放射性物質および非放射性標識物質から選択される。ラベル部の蛍光物質としては、フルオレセイン系列以外にも、フリーの官能基(例えばカルボキシル基、水酸基、アミノ基など)をもち、スペーサーを介してピューロマイシンまたはピューロマイシン様化合物などのヌクレオチド誘導体に連結可能な種々の蛍光色素(例えば、ローダミン系列、エオシン系列、NB D系列など)であれば如何なるものであってもよい。

【0008】その他、ラベル部としては、 $^{32}$ P、 $^{33}$ P、 $^{35}$ Sのような放射性標識物質、ビオチンのような補酵素、

タンパク質、ペプチド、糖類、脂質類、色素、ポリエチレングリコールなどの非放射性標識物質、あるいはラベル化可能な化合物であれば、その化合物の種類、大きさを問わない。

【0009】ラベル化試薬を構成する別の成分であるアクセプター部としては、通常、核酸または核酸誘導体を使用される。核酸誘導体としては、核酸とアミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質が化学的に結合した化合物を用いることができる。代表的な化合物として、アミド結合を有するピューロマイシン(Puromycin)、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド(3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、バリンのPANS-Val、アラニンのPANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するPANS-全アミノ酸化合物が挙げられる。また、化学結合として3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合した結果形成されたアミド結合でつながった3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド(3'-Aminoacyladenine aminonucleoside、AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、バリンのAANS-Val、アラニンのAANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するAANS-全アミノ酸化合物が利用できる。また、ヌクレオシドあるいはヌクレオチドとアミノ酸のエステル結合したものなども利用できる。その他、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格および塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合可能であれば、そのようにして結合した化合物は、すべて使用できる。

【0010】上記したピューロマイシン(第1図のIの化合物)は細菌(Nathans, D. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 585-592; Takeda, Y. et al. (1960) J. Biochem. 48, 169-177)および動物細胞(Ferguson, J. J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 57, 616-617; Nemeth, A. M. & de la Haba, G. L. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1190-1193)のタンパク質合成を阻害することが知られている。ピューロマイシンの構造はアミノアシルtRNAの構造と類似しているため、リボソーム上のAサイトに入り、Pサイトに存在しているペプチジルtRNAと反応し、ペプチジルピューロマイシンとしてリボソームから遊離する(Harris, R. J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 240, 244-262)。

【0011】タンパク質合成系において、終止コドンをもたない切断されたmRNAを鋳型に用いた場合、タンパク質合成が停止することが知られている。このように、mRNAに対応するコドンがない場合は、アミノアシル-tRNAや終止因子はリボソーム上のAサイトに入ってもペプチド転移反応で触媒されない。一方、このような状態でもピューロマイシンや本発明の誘導体は、リボソーム上のAサイトでリボソームのペプチド転移反応により触媒さ

れ、タンパク質のC末端に効率よく結合できることがわかった。

【0012】これを確かめるには、終止コドンをもつmRNAと終止コドンをもたないmRNAを作成し、蛍光性のピュロマイシン誘導体、たとえばフルオレセニルピュロマイシン (Fluorpur) (図1の11の化合物) と共に無細胞翻訳系に加え、タンパク質のC末端の蛍光ラベル化の効率を調べる必要がある。

【0013】タンパク質としては標準的な分子量をもつβ-ラクタマーゼ (分子量 32 kDa) の終止コドンのないものと、あるもののmRNAを調製するために、図2に示したような5'側からT7プロモーター、Kozak配列 (コザック配列)、β-ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないもの (A) とあるもの (B) の遺伝子DNAを作成した。

【0014】蛍光性のピュロマイシン誘導体としては、ラベル部としてフルオレセイン、アクセプター部としてピュロマイシンを選び、両者を化学結合で連結した蛍光性のラベル化合物、例えばFluorpur (第1図の11の化合物) を化学合成した。

【0015】真核生物の無細胞転写翻訳系、例えばウサギ網状赤血球抽出液 (Nuclease treated Rabbit reticulocyte lysate) や小麦胚芽抽出液の翻訳系において、上記のT7プロモーター、Kozak配列、β-ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないものとあるもののDNAからの転写産物 (加工mRNA) を鋳型として加え、Fluorpur存在下でタンパク質合成を行わせ、タンパク質の蛍光ラベル化について調べると、β-ラクタマーゼの全長タンパク質のC末端にFluorpurが、16μMの濃度で明確に結合していることがわかった (図3A)。Fluorpurによるβ-ラクタマーゼの全長タンパク質の蛍光ラベル化は、大腸菌の無細胞転写翻訳系でも確認された。特に、小麦胚芽抽出液の無細胞翻訳系を用いた場合、終止コドンのないmRNAの方 (図3のレーン1) が終止コドンのあるmRNA (図3のレーン3) に比べ、10倍程度ラベル化効率が增大することが確認された。

【0016】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものでない。

【0017】実施例1

真核細胞の無細胞翻訳系 (小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液) を使ったβ-ラクタマーゼのC末端蛍光ラベル化

<1>転写用DNAの構築とmRNAの作成

材料: β-ラクタマーゼ遺伝子の載ったpBR322プラスミド (Sutcliffe, J. G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3737-3741) は、石坂正道氏 (九州大学、三菱化学生命科学研究所) より供与された。E. coli pARベクター

(Rosenberg, A. H. et. al. (1987) Gene 56, 125-135) のT7プロモーターとKozak共通配列を含むDNAは日本製粉

(株) で合成された。PCR用DNAプライマーはエスベックオリゴサービス、DNA/RNAプライマーは日本ジェンセットによってそれぞれ合成された。各種酵素、試薬等は市販のものをを用いた: RNA分解酵素Ribonuclease A (シグマ); 核酸修飾酵素 T4 DNA Polynucleotide Kinase (NEB), T4 DNA ligase (NEB); 耐熱性DNA合成酵素 Gold Taq. Polymerase (Perkin-Elmer); RNA合成酵素キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega); キャップアナログ RNA capping Analog (Gibco BRL); 無細胞翻訳系キット: ウサギ網状赤血球抽出液 (Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, Promega), 小麦胚芽抽出液 (Wheat Germ Extract, Promega); 電気泳動試薬 アクリルアミド、アクリルアミドドービス、SDS、等はすべてナカライテスク製。プライマー除去剤Primer Remover はEdgeより購入した。

【0018】方法: 転写効率の高い大腸菌ウイルスT7のRNAポリメラーゼによって認識されるDNA配列 (T7プロモーター配列) と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識されやすい配列 (Kozak コンセンサス配列) をもったDNA (図2) を次のようにして構築した。まず、上記の配列をもつ領域とβ-ラクタマーゼ遺伝子をもつ領域を独立に作成する。T7プロモーター配列とKozakコンセンサス配列を含む1本鎖DNA (配列番号1) を化学合成し、DNAプライマー (配列番号2) とDNA/RNAプライマー (配列番号3) によってPCRを行う。一方、β-ラクタマーゼ遺伝子の載ったpBR322プラスミドを鋳型としてDNA/RNAプライマー (配列番号4) とDNAプライマー (配列番号5) でPCRすることにより、β-ラクタマーゼ遺伝子DNA領域を増幅する。これらをRRR法 (Nishigaki, K. et al. (1995) Chem. Lett. 131-132) に従って、それぞれのPCR反応液にリボヌクレアーゼAを加え、60℃で30分反応させることにより、DNA/RNAプライマー (配列番号3と配列番号4) のRNAの3'側のリン酸ジエステル結合を切断して突出末端を作る。これらをフェノール抽出後、プライマー・リムーバー (Primer Remover) によってプライマーおよび切断されたDNA断片を除去しエタノール沈殿させる。乾燥後、T4 DNA リガーゼ用バッファーに溶解しT4 DNA ポリヌクレオチド・キナーゼ (Polynucleotide Kinase) を加えて45℃、30分反応後、さらに30分かけて徐々に16℃に温度を下げてからT4 DNA リガーゼを加え、上述の2つのDNA領域を結合させた。この反応液の一部を採取し、DNAプライマー (配列番号2および配列番号5) を使って再度、PCRで増幅し、転写用に図2の(A) を作成した。

【0019】一方、終止コドンをもつβ-ラクタマーゼ遺伝子からなる転写用DNA (図2のB) は、上記の方法においてDNAプライマー (配列番号5) の代わりに別のDNA

プライマー（配列番号6）を用いることにより作成した。上記の方法で作成した2つのDNAは、RNA合成キット Ribomax Large Scale RNAProduction System (Promega) を使って転写した。合成効率を上げるためにキャップアナログ RNA capping Analog (Gibco BRL) を使い、mRNAの5'側を修飾した。キャップアナログおよび過剰のNTPを除去するためにプライマー・リムーバーを使ってエタノール沈殿を行なった。

【0020】<2>蛍光レベル化試薬Fluorpurの調製  
材料：ピューロマイシン (puromycin) はシグマから、フルオレダイト (6-N-carboxy-di-O-pivaloyl-fluorescein-hexyl-O-(2-cyanoethyl)-(N,N'-diisopropyl)-phosphoramidite) は日本パーセプティブから、テトラゾールは日本ミリポアから、クロマト用シリカゲルはメルクからそれぞれ購入した。

【0021】方法：ピューロマイシン (26 mg, 48  $\mu$ mol) を3 mlの乾燥ピリジンに溶かし、減圧下で蒸発させ、脱水させる。この操作を3回繰り返す。これに5 mlの4%テトラゾール/アセトニトリル溶液とフルオレダイトを加え、室温で撹拌させる。反応はシリカゲルの薄層クロマトグラフィー (TLC、展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1) でモニターする。通常、反応は2時間で終了する。反応後、溶媒を減圧下で追い出し、これに0.1 Mのヨウ素をテトラヒドロフラン/ピリジン/水=80:40:2に溶かした溶液 2 mlを加え、室温で撹拌させながら生成したホスファイト-トリエステルを酸化させる。1時間半後、溶媒を減圧下で除去し、残部をクロロフォルムで抽出する。抽出液は無水硫酸マグネシウム存在下で乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去する。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロフォルム/メタノール=90:10で溶出させる。保護基のついたFluorpurはシリカゲルTLC (展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1) でRf 0.26のところに出される。次に保護基の脱保護を行う。保護基のついたFluorpurを濃アンモニア水/エタノール=2:1の混合溶液 1 mlに加え、 $\beta$ -シアノエチル基を除去するとFluorpur (図1のII) が7mg得られる。合成品がFluorpurであることは、そのpH 9の溶液の紫外可視吸収スペクトルが272 nm (ピューロマイシン部由来) と494 nm (フルオレセイン部由来) に現われることと、MALDI/TOFマスマスペクトロメトリーで[M+H]<sup>+</sup>の分子イオンがm/z 1010に現われることから同定された。

【0022】<3>タンパク質の蛍光ラベル化  
作成したmRNAは、(1) ウサギ網状赤血球無細胞翻訳系 Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated (Promega) および (2) 小麦胚芽無細胞翻訳系 Wheat Germ Extract (Promega) の2種類の翻訳系においてFluorpurの最終濃度が16  $\mu$ Mになるように加え、それぞれの至

適反応温度 (ウサギ網状赤血球無細胞翻訳系; 30℃、小麦胚芽無細胞翻訳系; 25℃) で60分反応させた。

【0023】<4>タンパク質のラベル化の確認  
フルオレセニルピューロマイシン (Fluorpur) でラベル化されたタンパク質の確認は、上記の無細胞翻訳産物をサンプルとしてSDS-PAGEで20V定電圧、90分泳動したゲルを蛍光イメージング装置 (FluorImager 595, Molecular Dynamics) で直接読み取ることにより行った。最も効率よく蛍光ラベルされた全長 $\beta$ -ラクタマーゼ (分子量 32 kDa) は、小麦胚芽系無細胞翻訳系を用い、終止コドンのないDNA (図2のA) から転写したmRNAを使って、Fluorpurが最終濃度16  $\mu$ Mになるように加えた場合に得られた (図3Aのレーン1)。しかし、同じ小麦胚芽系無細胞翻訳系を用いて、Fluorpurが最終濃度16  $\mu$ Mであっても終止コドンのあるDNA (図2のB) から転写したmRNAを使用した場合には、その蛍光ラベル化の効率は終止コドンのないDNAの場合に比べ10分の1以下であった (図3Bのレーン3)。また、ウサギ網状赤血球の無細胞翻訳系においても、終止コドンのないDNAから転写したmRNAを使って翻訳させた系 (図3Aのレーン5) では、終止コドンのあるDNAから転写したmRNAを使った場合 (図3Aのレーン6) に比べ3~4倍ラベル化効率が上昇した。比較のため、従来のタンパク質の蛍光染色法 (SYPRO Orange) で同じゲルを染色したものが図3Bに示してある。SYPRO Orangeで染色した場合、投入したmRNAによって翻訳されたタンパク質 ( $\beta$ -ラクタマーゼ) は、無細胞翻訳系由来のタンパク質の中に埋もれて確認することができなかった。以上のことから、本発明の方法によるタンパク質のラベル化がSDS-PAGEによる合成タンパク質の同定において有効であることが確認された。

#### 【0024】

【発明の効果】本発明により、原核細胞と真核細胞とを問わず無細胞翻訳系および生細胞を利用して翻訳合成されたタンパク質のC末端を効率よく蛍光等によりラベル化することが可能になった。本発明は、遺伝子から発現されるタンパク質の同定と、それらの相互作用などの機能解析をより迅速に、安全かつ経済的に実施することを可能にする。その他、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質は、該タンパク質と結合するかあるいは相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物の同定にも有用である。すなわち、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質を、スクリーニングしようとする化合物と結合しない相互作用した結果、残存または消失する該タンパク質のC末端ラベルを検出する等の方法により該化合物をも同定できる。

#### 【配列表】

9

&lt;110&gt; Mitsubishi Chemical Corporation

<120> A process for the production of C-terminal labelled  
protein

&lt;130&gt;

&lt;140&gt;

&lt;141&gt; 1988-11-

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 88

10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

gatcccgca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggagatg

88

&lt;210&gt; 2.

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

gatcccgca aattaatacg actcactata ggg

33



10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (6)

&lt;223&gt; n is ribocytidylic acid.

&lt;400&gt; 3

10

ggaagncatg gtggcatctc cttcttaa

29

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (6)

&lt;223&gt; n is ribocytidylic acid.

20

&lt;400&gt; 4

gcttcnaaac aaagcactat tgcactggc

29

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

ccaatgctta atcagtggagg cacctatctc a

31

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

10

ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg ag

32

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1-6 : 合成DNA

【図面の簡単な説明】

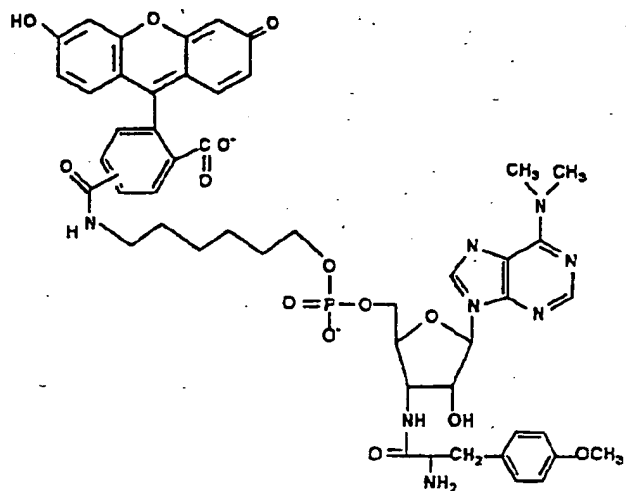
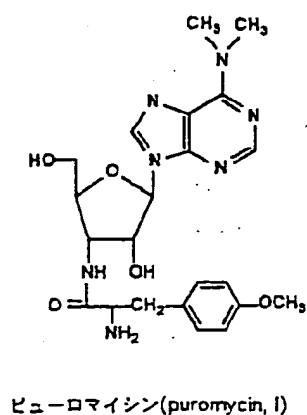
【図 1】 ピューロマイシンおよびその誘導体の化学構造。Iはピューロマイシン (puromycin)、IIはフルオレセニルピューロマイシン (Fluorpur) である。

【図 2】  $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子DNAの構築図。Aは終

止コドンのない遺伝子DNA、Bは終止コドンのある遺伝子DNA である。

【図 3】  $\beta$ -ラクタマーゼのC末端へのFluorpurの結合を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動写真(A)とそれをSYPRO Orangeで蛍光染色したポリアクリルアミドゲル電気泳動写真(B)。

【図 1】

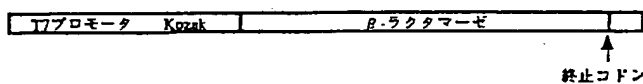


【図2】

(A)

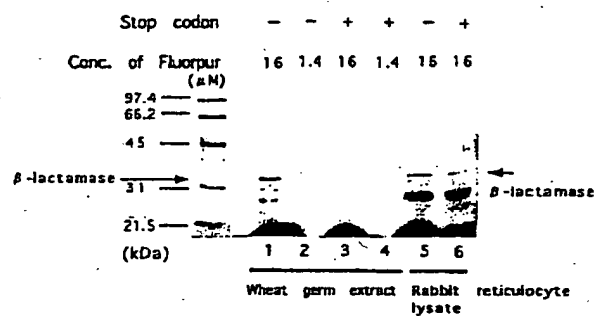


(B)

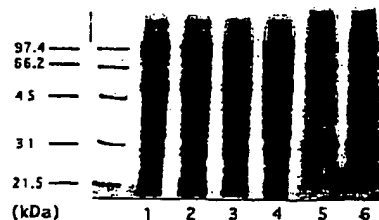


【図3】

(A)



(B)



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA01 CA02  
 CA04 CA11 CA12 CA20 DA01  
 DA02 DA05 DA11 GA11 GA17  
 GA18 GA19  
 4B064 AG01 CA01 CA19 CA50 CC01  
 CC24 CD30 CE14 DA13  
 4H045 AA20 BA54 BA70 BA71 EA50  
 EA65 FA74